



PCT/FR 00/01574

REC'D 14 JUL 2000
WIPO PCT

4

FR 00/01574

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

12 MAI 2000

Fait à Paris, le .....

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

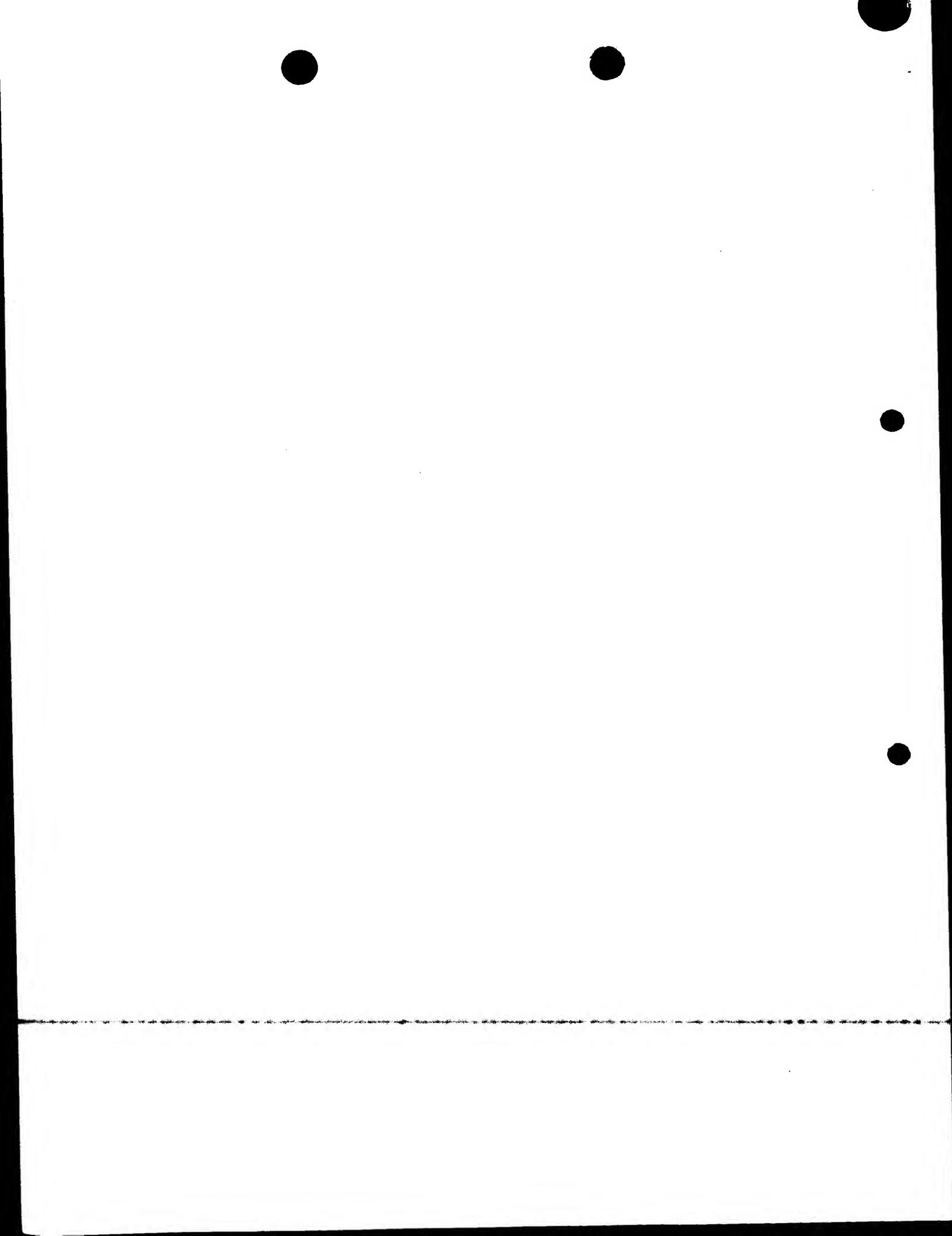
#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

SIEGE  
INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIETE  
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersbourg  
75800 PARIS Cedex 08  
Téléphone : 01 53 04 53 04  
Télécopie : 01 42 93 59 30





DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR  
(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 07362

TITRE DE L'INVENTION : Promoteur permettant l'expression de transgènes dans toute la plante hormis dans la graine

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE  
145, rue de l'Université 75007 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

DUBREUCQ Bertrand  
6, rue Fourcade  
75015 Paris, FR

LEPINIEC Loic  
2C rue E. Herriot  
91440 Bures sur Yvette, FR

CABOCHE Michel  
5, rue du Thimerais  
78310 Maurepas, FR

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

10 juin 1999

CABINET REGIMBEAU

*[Signature]*  
92125>

## **DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS**

**Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).**

5 La présente invention concerne l'isolement et la caractérisation d'un promoteur qui permet l'expression de transgènes dans la plante adulte, à des fins d'amélioration du développement de la plante, sans que le produit de ce transgène soit présent dans la graine mature et sèche. L'invention a également trait aux plantes transgéniques comportant un gène d'intérêt fusionné à ladite séquence promotrice.

10 Les techniques de biologie moléculaires permettent actuellement de modifier le patrimoine génétique des végétaux pour en changer les composantes qui contrôlent la production, la qualité ou la santé. La spécificité d'expression des transgènes introduits repose essentiellement sur l'utilisation de séquences promotrices de plantes ou de  
15 microorganismes. La recherche de promoteurs spécifiques est donc d'une importance capitale pour les biotechnologies végétales. Les graines constituent une composante importante de l'agriculture, en tant que semences, mais également dans l'alimentation ou l'industrie de transformation. A ce titre, la présence de protéines et produits nouveaux dans la graine peut poser des problèmes. Il apparaît donc intéressant de  
20 pouvoir disposer d'un promoteur actif dans tous les tissus végétatifs, mais inopérant dans les graines.

Les caractéristiques d'une graine vont dépendre des interactions entre la maturation, sous contrôle d'un programme génétique spécifique, et des conditions de  
25 l'environnement qui conditionnent pour une bonne part la production ultérieure. Les mécanismes régulateurs de ces phénomènes restent cependant largement incompris. Il existe donc un réel intérêt à maintenir une bonne qualité des lots de semences. Or, le développement des plantes transgéniques posent de nouveaux problèmes, notamment liés à l'expression de gènes hétérologues dans les graines desdites plantes. En effet, la  
30 présence de protéines ou de polypeptides dans les graines peut avoir des conséquences néfastes sur leur capacité à germer ou sur leur qualité. En outre, si la population se familiarise de plus en plus avec l'idée que les plantes comestibles peuvent être

modifiées génétiquement, des graines comestibles contenant le produit de transgènes pourraient ne pas être facilement acceptées.

Ainsi, l'objectif à la base de la présente invention est d'identifier un promoteur qui 5 permettrait une expression forte d'un transgène dans tous les tissus des plantes sauf dans la graine.

A cet effet, le piégeage de promoteur (« promoter trapping »), un outil puissant pour disséquer des processus développementaux (Topping and Lindsey 1995 pour revue), a 10 été mise en oeuvre. Cette stratégie est basée sur l'utilisation d'un vecteur de transformation des plantes possédant, à l'une de ses extrémités, un gène rapporteur (GUS ou GFP le plus souvent) sans promoteur. Si l'insertion se réalise dans une région codante et si la séquence du gène rapporteur est en phase, il y aura fusion traductionnelle entre la protéine endogène et la protéine du gène marqueur. Les 15 stratégies de piégeage de gène présentent un avantage majeur vis-à-vis de la mutagenèse insertionnelle classique car le phénotype (expression du gène rapporteur GUS) est dominant. Cette dominance du phénotype (GUS) permet de suivre les allèles mutés à l'état hétérozygote. Ceci est très intéressant pour l'étude de mutations qui sont 20 letales à l'état homozygote. Cette approche permet également de caractériser un gène par son expression.

Il a été trouvé lors de l'accomplissement de la présente invention, qu'une insertion d'un gène rapporteur dans le gène codant pour une protéine de type « fatty acid hydroxylase » (FAH) d'Arabidopsis conduit à une expression dans tous les tissus de la 25 plante sauf dans la graine. Ce type de promoteur est d'un très grand intérêt pour des applications biotechnologiques. Il permet de faire exprimer une protéine d'intérêt dès l'imbibition dans tous les tissus de la plante, avec un niveau d'expression élevé, hormis dans la graine. On peut donc, par exemple, protéger une plante contre de nombreux stress biotiques ou abiotiques sans modifier le contenu de sa graine. On peut également 30 faire exprimer une séquence antisens dirigée contre un gène cible dans tous les tissus sauf dans la graine.

**Description**

- Ainsi, la présente invention concerne une séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante hormis dans la graine en maturation et
- 5       dans la graine sèche, ladite séquence comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH d'Arabidopsis.
- De préférence, cette séquence comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité
- 10      avec la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.
- On entend par « % d'identité » le pourcentage de nucléotides identiques qui peut facilement être calculé par l'homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquence tel que le programme DNASIS (Version 2.5 pour Windows ; Hitachi Software Engineering Co., Ltd, South San Francisco, CA) en
- 15      utilisant les paramètres standards décrits dans le manuel du fabricant, incorporé dans la description par référence.
- Dans ce contexte, les séquences et les pourcentages d'identité peuvent également être obtenus en utilisant les ressources informatiques internet. On peut citer le programme Blast ([WWW.ncbi.nlm.nih.gov](http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov)) et le programme FastDB avec les paramètres suivants
- 20      « Mismatch penalty 1.00 ; Gap Penalty 1.00 ; Gap Size Penalty 0.33 ; joining penalty 30.0. Ces algorithmes sont présentés dans Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and Applications, pages 127-149, 1988, Ala R. Liss, Inc, incorporé dans la description par référence
- On peut également définir les séquences ayant 80% d'identité comme étant des
- 25      séquences s'hybridant à la séquence SEQ ID N°1 avec des conditions de stringence fortes. Ces conditions sont présentées dans Sambrook et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61, incorporés dans la description par référence.
- 30      Avantageusement, la séquence selon l'invention possède la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1 suivante :

5' cagctgttagcatctt gatattgctgataactcagccacaagatcgttcatgttactc  
 tctgcttcattaaactccatctcgccattcattttctgtgtaccaatgcaagaaaag  
 cttatctcaacatcaggctgatataaccaatatcttacttctttacatttgaaat  
 ggaaccaacccattttctggaaaaagtgctaaccacattgattaaccgtatcac  
 5 tactactttcattttatcttctgtttcattatgctgactatttaagctccgttgtca  
 aatctctaagtttagacataaaagacaaagactaatcaattgtcatcacaccagcgtcg  
 tcgagtgagctatattaatcgtggattttaaagcattaaagaaaacattctatagttacta  
 aagcaaataaaataattataatcaaacactatgctgacactggcacgtgtactggt  
 agtgaatgattctacatcataagaggccgcatcaaattctaaaaataagcataatga  
 10 attaatcattacaattttatatttactcaataagaaaatcgaaagtatgattattat  
 cttagctgccacaatcttcgaatttatatttactcaagaagagaccgactttatcct  
 tgactttctcatgctctatggaaaatgattaaagcagtcaataaaatctttgacat  
 tgttggcagaagaccaataattcgaagtctaaatgtaatcgtccacacagtgtatga  
 gtatccttagtattttttctttccatataagttgaattttaatataatagtgtatga  
 15 atgttgtttatttggcaacgtacaaaattggaaatcctataagtgcgacgacaagt  
 gacaagacgaggctatgaacagctaattgtatgaagagagccaaaagagcaacaacctg  
 gcacag-3'.

L'invention a également trait à l'utilisation de portion de la séquence SEQ ID N°1  
 20 pour l'identification de fragments capables de promouvoir l'expression d'un gène  
 d'intérêt dans une plante hormis dans la graine. Il est ainsi possible de définir la région  
 minimale de la séquence du promoteur du gène de la FAH pour assurer une expression  
 efficace. En ce sens, le promoteur peut être modifié par addition de séquences telles  
 des enhancers, par délétion de régions non essentielles et/ou non désirées. Le  
 25 promoteur peut comprendre des séquences synthétiques et/ou naturelles.

L'invention concerne un procédé permettant l'isolement et la caractérisation du  
 promoteur du gène de la FAH chez les plantes comprenant les étapes suivantes :

- a) Utilisation d'une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité  
 30 avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence  
 SEQ ID N°5 ou une séquence complémentaire, une amorce qui s'hybride dans des  
 conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 ou une

séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH d'Arabidopsis accessible sous le numéro AC003096 ou une séquence complémentaire, pour l'isolement et/ou l'amplification de la séquence en amont de  
 5 l'extrémité 5' du gène de la FAH,

- b) Clonage et séquençage de la séquence obtenue à l'étape a).

La SEQ ID N°5 correspond à la séquence codante du gène de la FAH d'Arabidopsis :

10 DEFINITION : ADNc complet de « *Arabidopsis thaliana fatty acid hydroxylase Fah1p* » (FAH1)  
 ACCESION : AF021804  
 ORGANISME : *Arabidopsis thaliana*, Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta;  
 Embryophyta; Tracheophyta ; Euphylllophytes; Spermatophyta; Magnoliophyta;  
 15 Eudicotyledons; Rosidae; Brassicales; Brassicaceae.

Référence : Mitchell,A.G. and Martin,C.E, (1997). *Fah1p, a saccharomyces cerevisiae cytochrome b5 fusion protein, and its arabidopsis thaliana homolog that lacks the cytochrome b5 domain both function in the alpha-hydroxylation of sphingolipid-associated very long chain fatty acids* ; J. Biol. Chem. 272 (45), 28281-28288  
 20 MEDLINE 98019193

```

 1 atggttgctc agggattcac tgtggatctt aaaaagcccc ttgtatttca gggtggtcata
 61 cttggagaag attatgagga atgggttcac caacctatcg cgaccaagga aggccctcggt
 25 121 tttttcaga gtgacttttg ggagttcttg acacttacag ttgggtgggc agttcctgtc
 181 atttggttgc cagttgttgt ctgggtcata tcaaggtagtgc taagtatggg atgttcactt
 241 ccagaaatcg tcccaatttg tgtcatggga atattcatct ggacattttt tgaatacggtt
 301 cttcacgggt tcgtttcca cataaaaacg aagagttact ggggaaacac tgcacactat
 361 ctatccatcg gatgtccatca taageaccccg atggacccatc tgggttgtt ttttctct
 30 421 actgcaactg cgatttatg cttccgttc tggAACATTG cgaaggctat ctcaactcct

```

481 tcaaccgcac ctgcattgtt tggggaggc atgctcgat atgtgatgtc cgtatgtcact  
 541 cattattacc ttccaccatgc ccaacctact agaccagtga ccaaaaatct caagaagtac  
 601 catttgaatc atcacttcag gattcaggac aaaggatttg gtataacttc gtcgttatgg  
 661 gacatagtct ttgggacact tccaccaca aaagccccca gaaaagagca atag

5

- Il est également possible d'utiliser une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH d'Arabidopsis (introns et exons) qui est accessible à l'homme du métier sous le numéro AC003096 ou une amorce qui s'hybride dans des conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 (*Arabidopsis thaliana, fatty acid hydroxylase Fah1p*) suivante :

MVAQGFTVDLKKPLVFQVGHLGEDYEEWVHQPIATKEGPRFFQSDFWEFLTL  
 TWWWAVPVIWLPVVVWCISRSVSMGCSLPEIVPIVVMGIFIWTFFEYVLHRFVF  
 15 HIKTKSYWGNTAHYLIHGCHHKHPMDHLRLVFPPPTATAILCFPFWNIAKAISTP  
 STAPALFGGGMLGYVMYDVTHYYLHHAQPTRPVTKNLKKYHLNHHFRIQDK  
 GFGITSSLWDIVFGTLPTTKAPRKEQ

- Ainsi, la séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, peut également être caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH susceptible d'être obtenue à partir du procédé décrit précédemment.

- 25 Un autre aspect de l'invention porte sur une cassette d'expression qui comporte une séquence d'intérêt fusionnée à une séquence comprenant une séquence promotrice telle que définie ci-dessus. Ladite séquence d'intérêt peut coder pour un ARN, une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique. La cassette peut permettre la co-suppression de l'expression d'un gène caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène. La séquence

d'intérêt peut également coder pour une séquence antisens dirigée contre un gène cible. Ceci permet, en couplant avec la surexpression ectopique d'un gène d'intérêt dans les graines, d'empêcher toute expression de ce gène dans d'autres tissus, l'antisens n'y étant pas exprimé. Ceci s'avère tout à fait utile dans le cas où l'on souhaite 5 surexprimer une protéine dans les graines sans perturber le développement d'autres tissus de la plante.

La cassette selon l'invention peut comprendre en outre un gène marqueur de sélection, une séquence leader contrôlant le transit, la sécrétion ou le ciblage du produit 10 d'expression, dans différents organelles une séquence signal de la terminaison de la transcription et de la traduction.

On entend par « gène d'intérêt » ou « transgène » dans le cadre de l'invention, un gène notamment sélectionné parmi les gènes codant pour une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, les gènes perturbateurs codant 15 pour un produit capable de se substituer et/ou d'inhiber la fonction ou l'expression d'un ARNm, d'une protéine ou d'un polypeptide endogène. On peut citer par exemple les gènes codant pour des ribozymes contre des ARNm endogènes, des gènes dont le produit de la transcription est au moins complémentaire en partie à un ARNm endogène cible (EP 240 208 incorporé dans la description par référence). On peut 20 également citer des gènes, dont le produit de la transcription est identique ou similaire aux transcripts de gènes endogènes, qui sont capables d'inhiber par co-suppression l'expression desdits gènes endogènes (Napoli C. et al., 1990, The Plant Cell, 2, 279-289, incorporé dans la description par référence). Bien entendu, le gène selon 25 l'invention peut coder pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de sorte à faire produire ou à favoriser la biosynthèse de métabolites, notamment de métabolites utiles pour l'alimentation humaine ou animale ou pouvant affecter le développement. La séquence promotrice selon l'invention peut induire l'expression d'un gène étranger et être utilisée dans différent types de plantes. Le terme « gène étranger » ou « transgène » est également compris comme définissant toute région d'ADN codante 30 ou non (protéine, polypeptide, antisens, ARN catalytique, viroïde etc...). Une protéine d'intérêt pour le développement et la production de la plante peut être produite de façon constitutive dans tous les organes de la plante en utilisant ce promoteur sans que

la composition de la graine soit affectée. Les protéines d'intérêt sont, de manière non exhaustive, celles qui permettent une meilleure protection de la plante vis-à-vis

- des stress biotiques : protection contre les pathogènes, bactéries, champignons, insectes, nématodes, parasites ou ravageurs, protection contre les virus et pathogènes

5 intacellulaires, en particulier ceux qui ne sont pas transmis par les graines

- des stress abiotiques : protection contre la chaleur et le froid, le gel, les stress hydriques tels que la sécheresse ou à l'inverse l'anoxie, la pollution (ozone, SO<sub>2</sub>), la photoinhibition et les stress lumineux, la verse, la phytorémédiation, ou les stress nutritionnels occasionnés par une carence ou excès d'un élément nutritif (en particulier

10 un stress salin).

Tout gène d'intérêt peut donc être placé sous le contrôle de la séquence promotrice isolée. Pour l'expression dans les plantes, ce gène peut comporter également des séquences 3' non transcrives possédant des signaux de polyadénylation actifs chez les

15 plantes. Ces séquences peuvent, par exemple, être celles codant la partie 3' transcrive non traduite du gène l'ARN 35S du virus de la mosaïque de choux fleur (35S CaMV) ou la région 3' non-traduite du gène codant la synthèse de la nopaline (NOS) du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens*.

20 Le gène d'intérêt selon l'invention peut également être un gène contrôlant le développement tel que par exemple un gène impliqué dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.

Un autre aspect de l'invention a trait à un vecteur, notamment un vecteur plasmidique, comprenant une cassette d'expression telle que définie ci-dessus.

25 L'invention a également pour objet une cellule de plante transformée avec la cassette ou avec un vecteur comprenant ladite cassette et un kit de transformation de plante comprenant ladite cassette ou ledit vecteur.

30 La préparation des plasmides, la construction des gènes chimériques et des cassettes d'expression, les restrictions de l'ADN par des endonucléases, la transformation et la confirmation des transformations sont réalisés selon les protocoles standards

(Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning Manual Cold Spring Harbor Laboratory, incorporés dans la description par référence).

La construction des vecteurs utilisables pour les expériences de transformation fait partie des techniques de biologie moléculaire connues et pratiquées de façon routinière  
5 dans ce champ d'applications.

Un aspect supplémentaire de l'invention porte sur un procédé de préparation de plantes transgéniques dans lesquelles un gène d'intérêt est exprimé dans tous les tissus sauf dans la graine en maturation et dans la graine sèche caractérisé en ce qu'il comprend  
10 les étapes suivantes :

- a) Transfert d'une cassette ou d'un vecteur selon l'invention dans des cellules de plantes,
- b) Mise en culture des cellules transformées obtenues à l'étape a) de manière à obtenir lesdites plantes transgéniques.

15 Le transfert de l'ADN à l'intérieur des cellules de plante, notamment des cellules de l'albumen ou des cellules totipotentes dérivées d'embryons immatures, peut être effectué par les techniques standards (Plant Cell Report, 10, 595, 1992), en particulier par transfert via Agrobacterium (Plant J., 1994, 6, 271), par électroporation (Nature, 20 1987, 327, 70), laserporation (Barley Genetics, 1991 VI, 231), par polyéthylène glycol, ou par la méthode biolistique dite « gun particule » (Nature, 1987, 327, 70). De manière générale, pour les vecteurs de transformations via une agrobactérie (infiltration in planta Bechtold et al. 1993), les vecteurs de transformation portent des marqueurs de sélection, des bordures d'ADN-T, des sites de clonage, des fonctions de réPLICATION, ainsi que d'autres éléments si nécessaire au bon transfert des transgènes  
25 (Bouchez et al. 1993). Les publications ci-dessus mentionnée sont incorporées dans la description par références.

30 La présente invention a également pour objet une plante transgénique susceptible d'être obtenue en mettant en œuvre le procédé mentionnée ci-dessus.

Par « plante susceptible d'être obtenue », on entend toute plante exprimant un transgène dans ses tissus sauf dans les graines matures et sèches, ladite plante possédant un promoteur selon l'invention. Les plantes obtenues par tout procédé équivalent conduisant au même résultat sont également objet de l'invention. La liste

5 des plantes chez lesquelles cette séquence promotrice peut être utilisée inclue plus particulièrement les plantes qui sont utiles pour toute industrie. On peut citer par exemple le colza, les crucifères, le maïs, le soja, le blé, le tournesol, le pois, les plantes ornementales, et les arbres.

10 Ainsi, l'invention concerne une plante, telle que définie ci-dessus, qui exprime dans ses tissus, sauf dans les graines, un gène dont le produit (ARN ou protéine) protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, une séquence antisens dirigée contre un gène cible, une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène ou une séquence codante pour une protéine  
15 impliquée dans la biosynthèse de métabolites ou un gène contrôlant le développement tel que par exemple un gène impliqué dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire. La plante selon l'invention peut également exprimer une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur autre que le promoteur du gène de la FAH et une séquence antisens capable  
20 d'inhiber l'expression de ladite protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur du gène de la FAH, de telle sorte que le gène d'intérêt n'est exprimé que dans les graines.

Les graines obtenues à partir d'une plante transgénique selon l'invention, qui ne contiennent donc pas le produit d'expression du transgène, sont visées par la présente  
25 invention, ainsi que leur utilisation en toute industrie.

Pour la suite de la description, on se référera aux légendes des figures présentées ci-dessous.

30 **Figure 1 : Structure intro / exon de l'ARNm du gène de la FAH**

Les rectangles avec les rayures représentent les introns.

L'échelle est présentée sur la figure.

T29F13 est un bac et TAI234un ADNc.

**Figure 2 : Structure de la région du gène FAH**

- PFAH upper et A1 représentent les amorces utilisées pour séquencer le promoteur.  
5 Les rectangles avec les rayures représentent la partie 5' transcrive non traduite.  
L'échelle est présentée sur la figure.

**Figure 3 : Carte du plasmide pBI 101**

Carte du plasmide pBI101 contenant le promoteur pFAH utilisé.

10

**Exemple 1 : Clonage du promoteur.**

**Matériels et méthodes**

15 **Isolement de la région promotrice de la FAH.**

La méthode utilisée pour l'extraction d'ADN génomique d'Arabidopsis s'inspire de celle décrite par Doyle et Doyle (1990). Le principe repose sur les propriétés détergentes du bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB; Sigma Chemical Co., USA) permettant la dénaturation spécifique des macromolécules protéiques et polysaccharidiques. Environ 2g de matériel végétal (plantules cultivées in vitro, âgées de 1 à 2 semaines) sont finement broyés dans l'azote liquide et transférés dans un tube de 50ml de type FALCON (Costar, USA), contenant 7.5ml de tampon d'extraction préchauffé à 65 °C .L'extraction s'effectue à 65°C pendant 30 minutes, sous agitation régulière. Les protéines dénaturées par le β-mercaptopropanol et le CTAB du tampon 20 sont ensuite extraites dans un volume de chloroforme puis éliminées après centrifugation (4430g, 10min). Les acides nucléiques du surnageant sont précipités par un volume d'isopropanol en présence d'acétate de sodium 3M (1/10, v/v), centrifugés (7900g, 10min) puis rincés à l'éthanol 70%. Le culot est repris en tube Eppendorf dans 100μl d'eau et les acides ribonucléiques sont éliminés par l'adjonction de 3μl de Rnase 25 A à 10mg/ml (Sigma Chemical Co., USA). L'ADN est déprotéinisé puis à nouveau précipité à l'éthanol absolu. Après centrifugation en tube Eppendorf le culot est lavé, séché, repris dans 50 à 100μl d'eau et conservé à -20°C avant analyses.

### **Amplification de l'ADN génomique.**

- La séquence promotrice a été amplifiée en utilisant la technologie de la PCR qui est une technique connue (Sambrook et al. 1989). Des amorces correspondantes à la partie 5'(upper) et 3'(lower) de la séquence promotrice ont été dérivées de la séquence génomique du BAC T29F13 (AC003096) (Voir figure 1). De l'ADN génomique d'une lignée de type sauvage (Ler) a été utilisé comme matrice pour l'amplification de la partie promotrice. Les réactions d'amplification ont été menées sur un thermocycleur (MJ Research PTC100 -96), dans des tubes de 0,2ml (Prolabo) contenant le mélange suivant:
- 10  $1 \mu\text{l}$  (10ng) ADN,  $2\mu\text{l}$  Tampon 10 x (BRL),  $2\mu\text{l}$  MgCl<sub>2</sub> 25mM,  $0,8\mu\text{l}$  dNTP 5mM,  $1\mu\text{l}$  Amorce 1 (10pmole/ $\mu\text{l}$ ),  $1\mu\text{l}$  Amorce 2 (10pmole/ $\mu\text{l}$ ),  $0,5\mu\text{l}$  (1U) Taq DNA polymérase (5U/ $\mu\text{l}$ ), H<sub>2</sub>O qsp 20 $\mu\text{l}$
- upper (5'-3') : TTCATGTTACTCTCTGCTTC (SEQ ID N°2)
- 15 lower (5'-3') GGAAAGGAAACAAATACGGATTG (SEQ ID N°3)

### **Transformation bactérienne.**

Les génotypes de bactéries utilisés pour la réalisation des expériences sont :

- 20 E. Coli souche DH12S ( $\phi$ 80 dlacZ ΔM15 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) araD139 Δ(ara,leu)7697 ΔlacX74 galU galK rpsL deoR nupG recA1/F'proAB+ lacIq ZΔM15).
- Agrobacterium tumefaciens pmp90C58CE
- 25 La transformation des bactéries (E.coli souche DH12S) par un plasmide recombiné est réalisée par électroporation (Potter, 1993). Dans une cuve à électroporation (1ml, largeur 0.1cm), 2 $\mu\text{l}$  de la réaction de ligature sont mélangés avec 50 $\mu\text{l}$  de bactéries décongelées et maintenues dans la glace. La cuve est ensuite placée dans un électroporateur (Gene Pulser II System; BIO-RAD, FRANCE) et une tension de 30 1.25kV est appliquée pendant un temps qui est fonction de la résistance (200Ω) et de la capacité (25μF) du circuit. Un ml de milieu SOC est ajouté pour favoriser la croissance des bactéries et le tout est incubé dans un tube de 10ml pendant 2 heures à 37°C, sous

agitation rotative (220rpm). Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur des boîtes contenant du milieu LB solide supplémenté avec l'antibiotique adéquat et incubées à 37°C pendant une nuit. La sélection des bactéries transformées par le plasmide pMeca recombiné se fait par 0,04mg/ml d'ampicilline en présence de 5 0,2mg/ml de X-Gal et de 0,05mg/ml d'IPTG. Pour les autres plasmides recombinés, la sélection des bactéries s'effectue sur un milieu LB avec l'antibiotique adéquat à une concentration finale de 0,04mg/ml.

#### Activité $\beta$ -glucuronidase.

- 10 Pour les graines, un semis est effectué sur deux épaisseurs de papier Whatman 1M de 4,7cm (Maindstone, Angleterre) imbibé par 2ml d'eau stérile. Après 48h d'imbibition dans une boîte saturée en eau, les graines sont raclées et placées dans un tube Eppendorf auquel sont ajoutés 100 $\mu$ l de tampon d'infiltration (100mM de Tampon phosphate pH7,2, 10mM EDTA, Triton X100 0,1% v/v) supplémenté en X-Gluc (5-15 Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-Glucuronic Acid). Le X-Gluc est dissout dans du DMF (diméthylformamide) à une concentration stock: 100 $\mu$ l (10mg/100 $\mu$ l). Le tampon d'infiltration est supplémenté au 1/100e extemporanément avec le stock de X-Gluc. Pour les autres tissus, les échantillons sont placés directement dans le tampon d'infiltration et la coloration est ensuite réalisée selon le même protocole.
- 15 20 L'infiltration est effectuée sous-vide (dans une cloche à vide):  
- le vide est cassé 2 fois.  
- le vide est maintenu pendant 1 heure, puis les échantillons sont placés à 37°C pour la nuit.

25 **Résultats**

Des analyses préliminaires ont indiqué qu'une enzyme impliquée dans le métabolisme des lipides (la « Fatty Acid Hydroxylase » : FAH) pourrait avoir une expression correspondant au type de promoteur ayant les caractéristiques recherchées.

- 30 La séquence du gène en question a été obtenue grâce aux séquences provenant du séquençage systématique du génome d'Arabidopsis thaliana et se trouve être localisée

sur le BACT29F13. Une séquence exprimée (EST TAI234) a été identifiée dans les bases de données et semble correspondre à une séquence pleine longueur de l'ARNm de la FAH. Ceci a permis l'identification de la séquence 5' transcrive non traduite et de l'emplacement prévu de la séquence promotrice. La structure intron/exon a été déduite, 5 au niveau de la partie transcrive non traduite, de l'alignement du BAC avec l'EST TAI234 (figure 1).

Le promoteur a été amplifié par PCR à partir de l'amorce pFAH/upper et l'amorce A1, placé dans la partie 5' transcrive non traduite (figure 2). Une étude de la séquence a 10 montré que la séquence amplifiée possède une boîte TATA putative à -100pb du site d'initiation présumé de la transcription (d'après l'ADNc pleine longueur) et une boîte CCAAT à -190pb de ce même début de transcription. Le fragment de PCR amplifié (932pb) a été cloné dans un vecteur pGEM-T (PROMEGA), séquencé, puis introduit 15 dans un vecteur binaire (pBI101, Clontech) contenant un gène rapporteur GUS sans promoteur (figure 3). Cette construction a ensuite été introduite par transformation in planta, via Agrobacterium, dans des plantes de type sauvage (écotype Ws). Treize transformants primaires ont été obtenus, qui ont été testés pour leur activité GUS pendant leur développement.

20 **Exemple 2 : Expression du gène rapporteur sous le contrôle du promoteur de gène de la FAH.**

L'expression est forte dès 20 heures après le début de l'imbibition dans l'embryon. 25 Durant le développement, l'expression est forte dans tous les tissus, avec une certaine préférence pour les tissus vasculaires.

Ces résultats démontrent que la séquence promotrice isolée confère bien un profil d'expression très spécifique au gène rapporteur utilisé (GUS). le promoteur est actif tout au long du développement de la plante, dans tous les tissus testés (feuilles, fleurs, 30 tiges, racines etc...) sauf dans la graine en cours de maturation (Voir tableau I ci-dessous).

Tableau 1 : Profil d'expression du gène rapporteur GUS

	cotylédons	feuille adulte	Racines	fleur	silique	graines en germination	Graines sèches
1	++	+++	++	++	+++	+++	-
2	+++	+++	++	++	+++	+++	-
3	+++	+++	++	++	nd	++	-
4	+++	+++	++	++	nd	++	-
5	+++	+++	++	++	nd	+++	-
6	+	+++	++	++	nd	+++	-
7	+++	+++	++	++	+++	+	-
8	++	+++	++	++	+++	+++	-
9	+++	+++	++	++	+++	++	-

- 5 L'expression du marqueur confirme la fonctionnalité du promoteur et sa spécificité. Ce type de promoteur est donc d'un très grand intérêt pour des applications biotechnologiques, telles que l'expression d'une toxine anti-insecte (type Bt) dans les plantes et l'expression de tout transgène permettant d'améliorer, de manière quantitative ou qualitative, le développement et la croissance de la plante sans que la 10 protéine codée par le transgène soit présente dans la graine.

REFERENCES

- Bechtold N., Ellis J. and Pelletier G. (1993). In planta Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie; 316: 1194-9
- Bouchez D., Camilleri C. Caboche M. (1993). A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie; 316: 1188-1193
- Doyle J.J. and Doyle J. L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue . Focus; 12: 13-15
- 15 Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989). ; Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y.

## LISTAGE DE SEQUENCE

<110> INSTITUT NATIONAL DE RECHERCHE AGRONOMIQUE - INRA

<120> PROMOTEUR PERMETTANT L'EXPRESSION DE TRANSGENES DANS  
TOUTE LA PLANTE HORMIS DANS LA GRAINE

<130> FAH

<140>  
<141>

<160> 5

<170> PatentIn Vers. 2.0

<210> 1

<211> 932

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<223> promoteur de la FAH chez Arabidopsis thaliana.

<400> 1

cagctgttagc atcttgatata tgctgataact cagccacaag atcgttcatg ttactctctg 60  
cttcattaaa ctccatctcg tccattcctt ctctgtgtta ccaatgcaag aaagcttac 120  
tcaacatcaag gctgatataa ccaatatctt acttctttta catttggaa atggAACAA 180  
cccatTTTC tggaaaaagt gctaaccAAA catttgatta accgtatcac tactactttc 240  
atttctatct tctgtttcat tatgctgact atttaagctc cggtgtcaaa tctctaagg 300  
agacataaaaa gacaaagact aatcaattgt catcacacca gcgtcgctga gtgagctata 360  
ttaatcgtgg atttaagca ttaaagaaac attctatagt actaaagcaa ataaaataat 420  
tataatcaaa cactatgctt gacactggtc acgtgtactg gtatgtaatg attctacatc 480  
ataagaggcc gcatcaaaat cctaaaaata agcataatga attaattcatt tacaaatttt 540  
attttactca ataagaaaat cgaaagtatg attattatct agctgccaca atcttcgaat 600  
ttaatattta ctcaagaaga gaccgacttt aatccttgac tttctcattt ctctatggaa 660  
aatgattaaa gcagtcaata aaatctttg acattgttgg cagaagacca ataattcgaa 720  
gtctaaaatg taatcgtcca cacagtgtat gagtatccta gtatTTTT tctttccat 780  
ataagttgaa tttgtatata atatagtgtat atgttgttta tttgtggcaa cgtacaaaat 840  
tgggaatcct ataagtgcga cgacaagtga caagacgagg ctatgaacag ctaatgtatg 900  
aagagagcca aaagagcaac aacctggcac ag 932

<210> 2

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amorce upper

<400> 2

~~ttcatgttac tctctgcttc~~

20

<210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Amorce lower

&lt;400&gt; 3

ggaaaggaaaa caaatacgga ttc

23

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 237

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; fatty acid hydroxylase Fah 1p

&lt;400&gt; 4

Met	Val	Ala	Gln	Gly	Phe	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Lys	Pro	Leu	Val	Phe
1									10					15	

Gln	Val	Gly	His	Leu	Gly	Glu	Asp	Tyr	Glu	Glu	Trp	Val	His	Gln	Pro
									25				30		
20															

Ile	Ala	Thr	Lys	Glu	Gly	Pro	Arg	Phe	Phe	Gln	Ser	Asp	Phe	Trp	Glu
									40				45		
35															

Phe	Leu	Thr	Leu	Thr	Val	Trp	Trp	Ala	Val	Pro	Val	Ile	Trp	Leu	Pro
										55		60			
50															

Val	Val	Val	Trp	Cys	Ile	Ser	Arg	Ser	Val	Ser	Met	Gly	Cys	Ser	Leu
										75			80		
65															

Pro	Glu	Ile	Val	Pro	Ile	Val	Val	Met	Gly	Ile	Phe	Ile	Trp	Thr	Phe
										90			95		
85															

Phe	Glu	Tyr	Val	Leu	His	Arg	Phe	Val	Phe	His	Ile	Lys	Thr	Lys	Ser
												105		110	
100															

Tyr	Trp	Gly	Asn	Thr	Ala	His	Tyr	Leu	Ile	His	Gly	Cys	His	His	Lys
												125			
115															

His	Pro	Met	Asp	His	Leu	Arg	Leu	Val	Phe	Pro	Pro	Thr	Ala	Thr	Ala
												140			
130															

Ile	Leu	Cys	Phe	Pro	Phe	Trp	Asn	Ile	Ala	Lys	Ala	Ile	Ser	Thr	Pro
												155		160	
145															

Ser	Thr	Ala	Pro	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Met	Leu	Gly	Tyr	Val	Met	
												170		175	
165															

Tyr	Asp	Val	Thr	His	Tyr	Tyr	Leu	His	His	Ala	Gln	Pro	Thr	Arg	Pro
												185		190	
180															

Val	Thr	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Tyr	His	Leu	Asn	His	His	Phe	Arg	Ile
												200		205	
195															

Gln	Asp	Lys	Gly	Phe	Gly	Ile	Thr	Ser	Ser	Leu	Trp	Asp	Ile	Val	Phe
												210		220	
210															

Gly Thr Leu Pro Thr Thr Lys Ala Pro Arg Lys Glu Gln

225

230

235

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 714

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;220&gt;

<223> Sequence codante pour la fatty acid hydroxylase  
Fah 1P

&lt;400&gt; 5

atggttgctc agggattcac tgtggatctt aaaaagcccc ttgtatttca ggttgtcat 60  
cttggagaag attatgagga atgggttcac caacctatcg cgacccaagga aggcctcg 120  
tttttcaga gtgacttttgg gagttcttg acacttacag tttggggc agttcctgtc 180  
atttggttgc cagttgttagt ctggtgcata tcaaggtagt taagtatggg atgttca 240  
ccagaaatcg tcccaattgt tgtcatggg atattcatct ggacatttt tgaatacg 300  
cttcaccggc tcgtttcca cataaaaacg aagagttact ggggaaacac tgacacactat 360  
cttattcacg gatgccatca taagcacccg atggaccacc ttcggctcgt ctttcctc 420  
actgcaactg cgattttatg cttccgttc tggAACATTG cgaaggctat ctcaactcct 480  
tcaaccgcac ctgcattgtt tggggagggc atgctcgat atgtgatgta cgatgtcact 540  
cattattacc ttcaccatgc ccaacctact agaccagtga ccaaaaatct caagaagtac 600  
catttgaatc atcacttcag gattcaggac aaaggatttg gtataacttc gtcgttatgg 660  
gacatagtct ttgggacact tcccaccaca aaagccccca gaaaagagca atag 714

REVENDICATIONS

1. Séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH d'Arabidopsis.  
5
- 10 2. Séquence selon la revendication 1 caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.
- 15 3. Séquence selon la revendication 2 caractérisée en ce qu'elle comprend la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.
4. Procédé permettant l'isolement et la caractérisation du promoteur du gène de la FAH chez les plantes comprenant les étapes suivantes :  
20 a) Utilisation d'une amorce comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence SEQ ID N°5 ou une séquence complémentaire, une amorce qui s'hybride dans des conditions stringentes fortes à toute séquence codante pour la SEQ ID N°4 ou une séquence ayant au moins 80% d'identité avec une séquence possédant au moins 10 nucléotides consécutifs de la séquence génomique du gène de la FAH  
25 d'Arabidopsis accessible sous le numéro AC003096 ou une séquence complémentaire, pour l'isolement et/ou l'amplification de la séquence en amont de l'extrémité 5' du gène de la FAH,  
b) Clonage et séquençage de la séquence obtenue à l'étape a).
- 30 5. Séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité

avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH susceptible d'être obtenue à partir du procédé selon la revendication 4.

6. Utilisation d'une séquence selon l'une des revendications 1 à 3 et 5 pour l'identification de fragments de la séquence SEQ ID N°1 permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante, hormis dans la graine en maturation et dans la graine sèche.  
5
7. Cassette d'expression caractérisée en ce qu'elle comporte une séquence d'intérêt fusionnée à une séquence comprenant une séquence promotrice selon l'une des revendications 1 à 3 et 5.  
10
8. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour un ARN, une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, ou qui est impliquée dans le développement notamment dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.  
15
9. Cassette d'expression selon la revendication 7 permettant la co-suppression d'un gène caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène.  
20
10. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une séquence antisens dirigée contre un gène cible.  
25
11. Cassette d'expression selon la revendication 7 caractérisée en ce que ladite séquence d'intérêt code pour une enzyme impliquée dans la production de métabolites par une plante.  
30
12. Vecteur comprenant une cassette d'expression selon l'une des revendications 7 à 10.  
12. Vecteur comprenant une cassette d'expression selon l'une des revendications 7 à 10.
13. Cellule de plante transformée avec une cassette selon l'une des revendications 7 à 35 10 ou un vecteur selon la revendication 12.

14. Kit de transformation de plante comprenant une cassette selon l'une des revendications 7 à 10 ou un vecteur selon la revendication 12.
- 5    15. Procédé de préparation de plantes transgéniques dans lesquelles un gène d'intérêt est exprimé dans tous les tissus sauf dans la graine en maturation et dans la graine sèche caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
- a) Transfert d'une cassette selon l'une des revendications 7 à 10 ou d'un vecteur selon la revendication 12 dans des cellules de plantes,
- 10    b) Mise en culture des cellules transformées obtenues à l'étape a) de manière à obtenir lesdites plantes transgéniques.
16. Procédé selon la revendication 15 caractérisé en ce que les cellules sont choisies parmi les cellules embryonnaires provenant d'un embryon immature.
- 15
17. Procédé selon l'une des revendications 15 et 16 caractérisé en ce que le transfert est effectué en utilisant Agrobacterium, de préférence Agrobacterium.tumefaciens.
18. Plante transgénique susceptible d'être obtenue en mettant en œuvre le procédé
- 20    selon l'une des revendications 15 à 17.
19. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, un ARN, une séquence antisens dirigée contre un gène cible.
- 25
20. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, un ARN, une protéine ou un polypeptide capable de se substituer à la fonction d'une protéine ou d'un polypeptide endogène.
- 30    21. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime une protéine d'intérêt sous le contrôle d'un promoteur autre que le promoteur du gène de la FAH et une séquence antisens capable d'inhiber l'expression de ladite protéine d'intérêt sous le contrôle du promoteur du gène de la FAH, de telle sorte que la protéine d'intérêt n'est exprimée que dans les graines.

22. Plante selon la revendication 18 caractérisée en ce qu'elle exprime dans ses tissus, sauf dans les graines matures et sèches, une séquence codante pour une protéine impliquée dans la biosynthèse de métabolites, pour une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, une protéine contrôlant le développement notamment dans le métabolisme des hormones, dans la transduction des signaux, ou dans le contrôle du cycle cellulaire.
- 5
23. Plante selon l'une des revendications 18 à 22 caractérisée en ce qu'elle est choisie notamment parmi le colza, les crucifères, le maïs, le soja, le blé, le tournesol, le 10 pois, les plantes ornementales, et les arbres.
24. Graines obtenues à partir d'une plante transgénique selon l'une des revendications 18 à 23 caractérisées en ce qu'elles ne contiennent pas le produit d'expression du transgène.

**Description**

Ainsi, la présente invention concerne une séquence promotrice permettant l'expression d'un gène d'intérêt dans les tissus d'une plante hormis dans la graine en maturation et

- 5 dans la graine sèche, ladite séquence comprenant une séquence ayant au moins 80% d'identité avec la séquence ou une portion de la séquence du promoteur du gène de la FAH d'Arabidopsis.

- De préférence, cette séquence comprend une séquence ayant au moins 80% d'identité  
10 avec la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1.

On entend par « % d'identité » le pourcentage de nucléotides identiques qui peut facilement être calculé par l'homme du métier en utilisant un programme informatique de comparaison de séquence tel que le programme DNASIS (Version 2.5 pour Windows ; Hitachi Software Engineering Co., Ltd, South San Francisco, CA) en  
15 utilisant les paramètres standards décrits dans le manuel du fabricant, cité dans la description par référence.

Dans ce contexte, les séquences et les pourcentages d'identité peuvent également être obtenus en utilisant les ressources informatiques internet. On peut citer le programme Blast ([WWW.ncbi.nlm.nih.gov](http://WWW.ncbi.nlm.nih.gov)) et le programme FastDB avec les paramètres suivants  
20 « Mismatch penalty 1.00 ; Gap Penalty 1.00 ; Gap Size Penalty 0.33 ; joining penalty 30.0. Ces algorithmes sont présentés dans Current Methods in Sequencing and synthesis Methods and Applications, pages 127-149, 1988, Ala R. Liss, Inc, cité dans la description par référence

On peut également définir les séquences ayant 80% d'identité comme étant des séquences s'hybridant à la séquence SEQ ID N°1 avec des conditions de stringence fortes. Ces conditions sont présentées dans Sambrook et al. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press, 1989) aux paragraphes 11.1 à 11.61, cités dans la description par référence.

- 30 Avantageusement, la séquence selon l'invention possède la séquence ou une portion de la séquence SEQ ID N°1 suivante :

d'intérêt peut également coder pour une séquence antisens dirigée contre un gène cible. Ceci permet, en couplant avec la surexpression ectopique d'un gène d'intérêt dans les graines, d'empêcher toute expression de ce gène dans d'autres tissus, l'antisens n'y étant pas exprimé. Ceci s'avère tout à fait utile dans le cas où l'on souhaite 5 surexprimer une protéine dans les graines sans perturber le développement d'autres tissus de la plante.

La cassette selon l'invention peut comprendre en outre un gène marqueur de sélection, une séquence leader contrôlant le transit, la sécrétion ou le ciblage du produit 10 d'expression, dans différents organelles une séquence signal de la terminaison de la transcription et de la traduction.

On entend par « gène d'intérêt » ou « transgène » dans le cadre de l'invention, un gène notamment sélectionné parmi les gènes codant pour une protéine ou un polypeptide qui protège la plante contre un stress biotique ou abiotique, les gènes perturbateurs codant 15 pour un produit capable de se substituer et/ou d'inhiber la fonction ou l'expression d'un ARNm, d'une protéine ou d'un polypeptide endogène. On peut citer par exemple les gènes codant pour des ribozymes contre des ARNm endogènes, des gènes dont le produit de la transcription est au moins complémentaire en partie à un ARNm endogène cible (EP 240 208 cité dans la description par référence). On peut également 20 citer des gènes, dont le produit de la transcription est identique ou similaire aux transcripts de gènes endogènes, qui sont capables d'inhiber par co-suppression l'expression desdits gènes endogènes (Napoli C. et al., 1990, The Plant Cell, 2, 279-289, cité dans la description par référence). Bien entendu, le gène selon l'invention peut coder pour une enzyme impliquée dans le métabolisme de sorte à faire produire 25 ou à favoriser la biosynthèse de métabolites, notamment de métabolites utiles pour l'alimentation humaine ou animale ou pouvant affecter le développement. La séquence promotrice selon l'invention peut induire l'expression d'un gène étranger et être utilisée dans différents types de plantes. Le terme « gène étranger » ou « transgène » est également compris comme définissant toute région d'ADN codante ou non (protéine, 30 polypeptide, antisens, ARN catalytique, viroïde etc...). Une protéine d'intérêt pour le développement et la production de la plante peut être produite de façon constitutive dans tous les organes de la plante en utilisant ce promoteur sans que

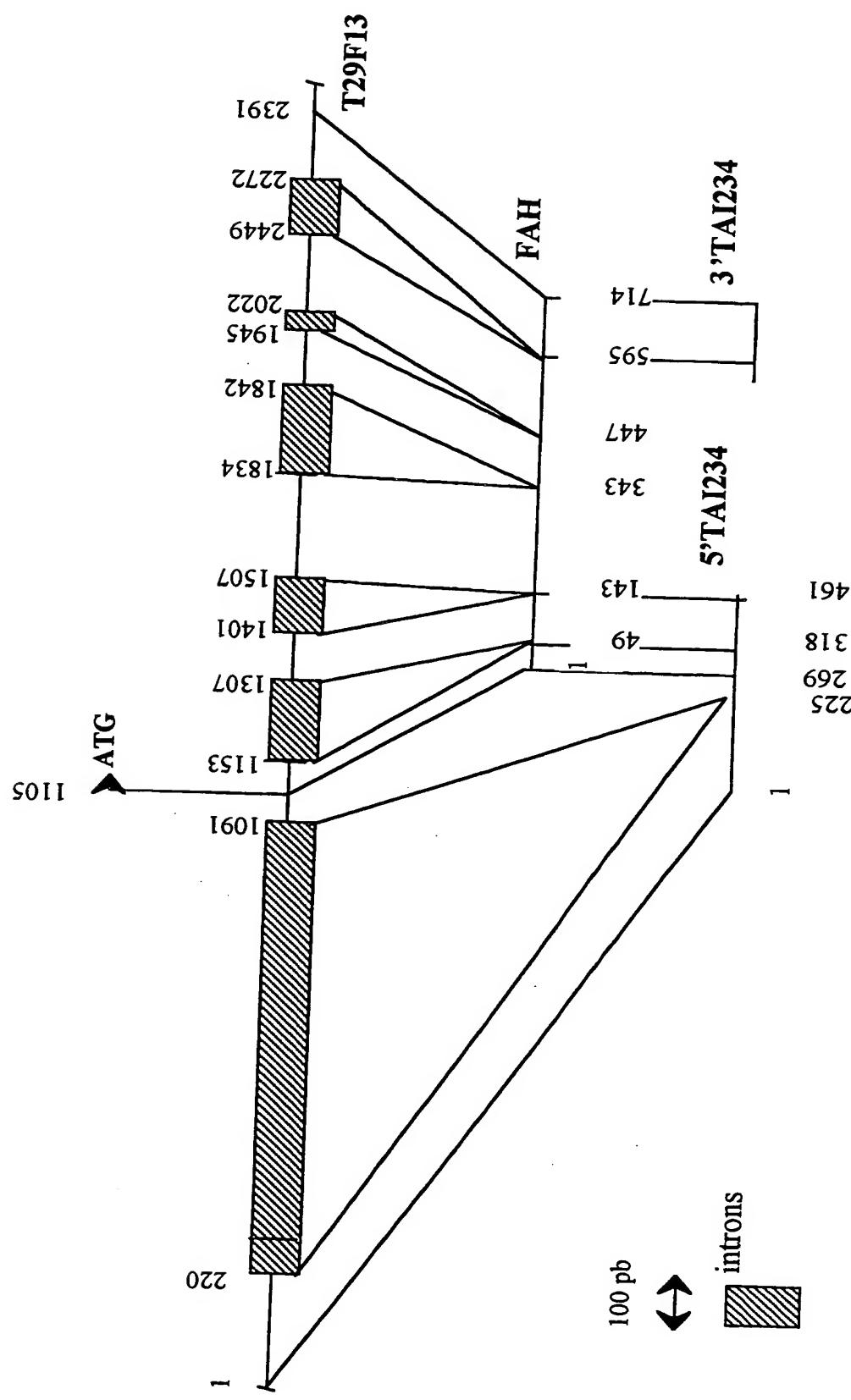


FIGURE 1

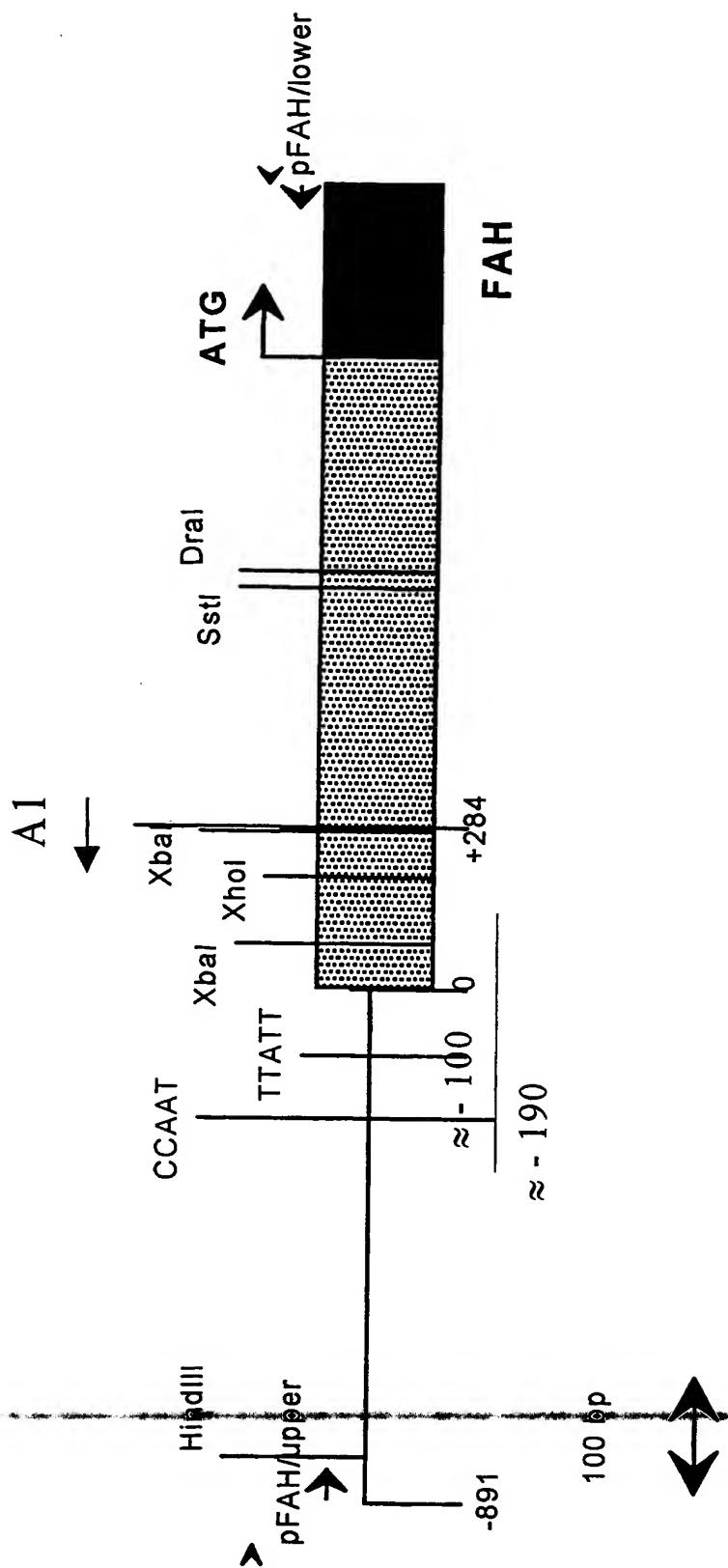


FIGURE 2

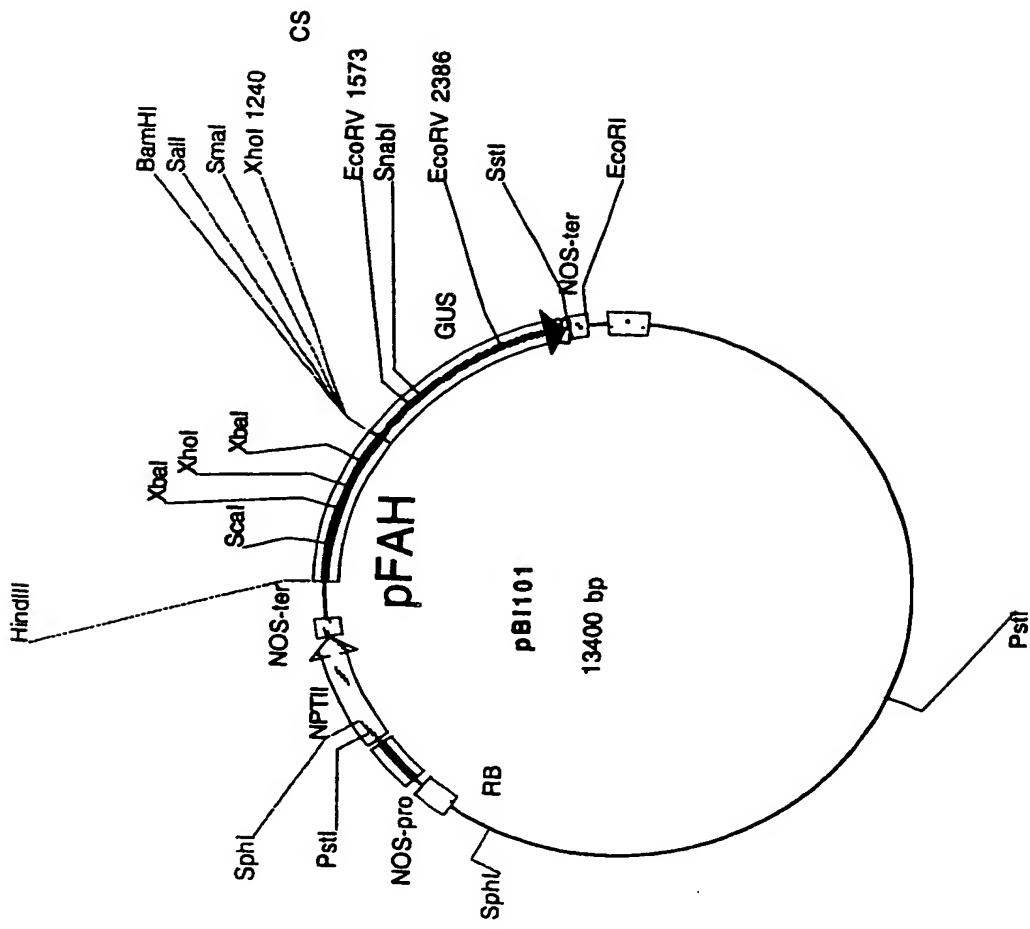


FIGURE 3

